

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-047500

(43)Date of publication of application : 07.03.1986

(51)Int.Cl.

C07K 15/04  
A61K 39/395  
C12N 15/00  
C12P 21/00  
G01N 33/577  
//(C12N 15/00  
C12R 1:91 )  
(C12P 21/00  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 59-169370

(71)Applicant : RES DEV CORP OF JAPAN

(22)Date of filing : 15.08.1984

(72)Inventor : TANIGUCHI KATSU  
KUROSAWA YOSHIKAZU  
SUGITA KOZO

## (54) CHIMERA MONOCLONAL ANTIBODY AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A chimera monoclonal antibody consisting of a variable region originated from an animal other than human, and a constant region originated from human.

USE: A monoclonal antibody giving low side effects such as anaphylactic shock and serum diseases when administered to human body.

PREPARATION: The objective chimera monoclonal antibody can be produced by separating active VH and VL genes from an antibody-producing cell of an animal other than human and CH and CL genes from human DNA, inserting the genes into a manifestation vector, and introducing the vector to a cultured animal cell.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-47500

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986) 3月7日

C 07 K 15/04  
A 61 K 39/395  
C 12 N 15/00  
C 12 P 21/00  
G 01 N 33/577  
/(C 12 N 15/00  
C 12 R 1:91)  
(C 12 P 21/00  
C 12 R 1:91)

6464-4H  
7043-4C  
7115-4B  
7235-4B  
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全10頁)

⑮ 発明の名称 キメラモノクローナル抗体及びその製造法

⑯ 特 願 昭59-169370

⑰ 出 願 昭59(1984) 8月15日

⑱ 発 明 者 谷 口 克 千葉市小仲台3-17-12

⑲ 発 明 者 黒 沢 良 和 名古屋市昭和区天白町八事富士見丘20-1 ライオンズマ  
ンション八事ガーデン2-215

⑳ 発 明 者 杉 田 幸 三 名古屋市千種区日岡町1丁目60 榎南荘

㉑ 出 願 人 新技術開発事業団 東京都千代田区永田町2丁目5番2号

㉒ 代 理 人 弁理士 田 中 宏

明 細 書

方 法

1 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

2 特許請求の範囲

- (1) ヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるキメラモノクローナル抗体
- (2) ヒト以外の動物としてマウスである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (3) ヒト以外の動物としてラットである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (4) ヒト以外の動物の抗体産生細胞から単離した活性化 $V_H$ と $V_L$ 遺伝子及びヒトDNAから単離した $C_H$ と $C_L$ 遺伝子を発現ベクターに挿入し、動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を生産することを特徴とするヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域とからなるキメラモノクローナル抗体の製造

- (5) 抗体産生細胞としてハイブリドーマ、エプスタインバールウイルスによる形質転換B細胞またはクローン化B細胞を用いる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (6) ベクターとしてpSV2-gpt, pSV2-neo, SV40からなる群から選ばれたベクターを使用することからなる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (7) 動物培養細胞がヒト、サル、マウス等の動物に由来するリンパ腫、腎細胞、L細胞、Co8細胞、HeLa細胞の何れか一種を使用する特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法

3 発明の詳細な説明

本発明はキメラモノクローナル抗体及びその製造法に関し、特に人体に投与した場合にアナフィラキシーショックや血毒症などの副作用の少ないモノクローナル抗体及びその製造法に関する。

単一抗原決定基だけを認識するモノクローナル抗体は免疫学全体に大きな影響を与え、その有用性は医学界にとゞまらず生物学、薬学、化学などの多くの分野で証明されている。そして、このモノクローナル抗体を得る方法に関しては1975年 Köhler と Milstein がヒツジ赤血球で免疫したマウスの脾細胞とマウスミエロマ細胞とを細胞融合させることで実現し (Nature 256 495-497 (1975))、この外エプスタイン-バー (Epstein-Barr) ウイルスによる方法などがある (特開昭58-201723号参照)。しかし、これらのモノクローナル抗体の多くはそれ自体がマウス等人間以外の動物に由来するためそれを人間に投与した場合には異種蛋白を注射することになり、その結果、アナフィラキシーショックや血清病などの副作用がおこることが予想される。そのため、ヒトハイブリドーマを用いてヒトモノクローナル抗体を作成する試みがなされている。(例えば特開昭57-126424、特開昭57-502090、特開昭58-90517、特開昭

-3-

59-128323及び特開昭57-502090号参照)これらによればヒト型のモノクローナル抗体を得ることは可能であるが必ずしも再現性等の点において満足すべきものとは云えない。(Nature 300 315-317 (1982)参照)

また、マウス等の動物は容易に種々の抗原で免疫することは可能であるが人間については望む抗原を用いて自由に免疫できないという欠点がある。一方、ヒト型モノクローナル抗体を産生するヒトXマウスハイブリドーマを作製して、μ鎖特異的mRNAを得たのち相補鎖DNAを作製し、プラスミドpBR 322に組み込んで大腸菌にヒトモノクローナル抗体を生産させる試みを行っているがこの方法も人間には自由に免疫できないという点で問題が残る。

本発明者はこれらの欠点を改善すべく種々の研究を行い本発明を完成するに至つたのである。すなわち本発明はヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるキメラモノクローナル抗体であつて、この製造方法はヒト以外の動

物の抗体産生細胞から単離した活性な $V_H$ と $V_L$ 遺伝子及びヒトDNAから単離した $O_H$ と $O_L$ 遺伝子を発現ベクターに挿入し動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を生産させることからなる。ここで「活性な $V_H$ と $V_L$ 遺伝子」とは抗体産生細胞においてDNAの再配列によつて出来た $V_H$ にあつてはV-D-J、 $V_L$ にあつてはV-J構造を有する機能的な遺伝子である。しかし、本発明においてヒト以外の動物としてはマウス、ラット、サル、羊、ウサギ等であり、また、抗体産生細胞としては好ましくはハイブリドーマ、クローン化B細胞或はエプスタイン-バーウイルスによる形質転換B細胞を用いることが望ましく、発現ベクターとしてはpSV2-gpt、pSV2-neo、SV40が好適である。動物培養細胞には、ヒト、サル、マウス等の動物に由来するリンパ腫、腎細胞、L細胞、O6細胞、HeLa細胞の何れかを用いることができる。

しかし、本発明に従えばヒト以外の動物は自由に免疫できるので容易に所望のキメラモノクローナル抗体を得ることができると共に、人間に投

与した場合動物由来のモノクローナル抗体に比して異種蛋白による抗原性が著しく軽減されることが期待される。

次に実施例をもつて本発明を説明する。

実施例

マウスV遺伝子の単離

腫瘍細胞P3U1とO57BL/6マウスに自然発生した黒色腫瘍細胞で免疫したO57BL/6マウスに由来する脾臓細胞との融合細胞であるハイブリドーマD10株(注、正式にはM2590株である。)は黒色腫瘍細胞と選択的に反応する抗体を分泌し、この抗体のタイプはH鎖についてはIgM型で、L鎖についてはI $\kappa$ である。先づD10株、P3U1株及びO57BL/6マウス腎臓からDNAを単離す(Os1124353-356(1981)参照)次に10ngのDNAを制限酵素HindIIIとEcoRIで切断する。制限酵素のHindIIIで切断したD10株とP3U1株及びO57BL/6マウス腎臓のDNAを電気泳動で0.9%のアガロースゲルに展開しニトロセルロース膜(Schlaicher and Schvell, J. Mol. Biol. 98 503

-4-

と

与した場合動物由来のモノクローナル抗体に比して異種蛋白による抗原性が著しく軽減されることが期待される。

次に実施例をもつて本発明を説明する。

実施例

マウスV遺伝子の単離

腫瘍細胞P3U1とO57BL/6マウスに自然発生した黒色腫瘍細胞で免疫したO57BL/6マウスに由来する脾臓細胞との融合細胞であるハイブリドーマD10株(注、正式にはM2590株である。)は黒色腫瘍細胞と選択的に反応する抗体を分泌し、この抗体のタイプはH鎖についてはIgM型で、L鎖についてはI $\kappa$ である。先づD10株、P3U1株及びO57BL/6マウス腎臓からDNAを単離す(Os1124353-356(1981)参照)次に10ngのDNAを制限酵素HindIIIとEcoRIで切断する。制限酵素のHindIIIで切断したD10株とP3U1株及びO57BL/6マウス腎臓のDNAを電気泳動で0.9%のアガロースゲルに展開しニトロセルロース膜(Schlaicher and Schvell, J. Mol. Biol. 98 503

-5-

-1152-

-6-

~515 (1978) 参照) に転写し、一方は領域を含んだ 2.7 Kb HindIII-HindIII 断片に相当する (利根川進氏より得た、Nature 280:288~294 (1979) 参照) J<sub>κ</sub> プロンプ (10<sup>7</sup> cpm/0.1 DNA) を用いたハイブリダイゼーションを行ったその結果を図 1 A (a) に示す。

ところで図 1 A (a) より明らかなように D10 株の DNA は 6.5, 6.3 及び 6.1 Kb の 3 つの再配列したバンドが存在する。これらのうち 6.3 及び 6.1 Kb は PSUIDNA に見られるものと同様のものである。6.5 Kb のバンドは V<sub>κ</sub>-J<sub>κ</sub> 構造を含む活性な遺伝子であり、その特異性の発現に關与する遺伝子である。分子サイズは λファージの HindIII マーカーによつて見積つた。このサイズに相当する DNA 断片をアガロース電気泳動により単離し、λファージ HindIII ベクター λ788 (K. Murray 氏 (エジンバラ大学) より得た、Molec. Gen. Genet., 150:59-61 (1977) 参照) に挿入し、λファージにパッケージした。パッケージミクスチャーには大腸菌 BHB2688 と BHB2690 を用いた。(Hahn,

-7-

クローン VJ<sub>κ</sub>1.4 は機能的な V<sub>κ</sub>-J<sub>κ</sub> 構造を含んでいる。

ノーザンハイブリダイゼーションの方法は免疫実験操作法 XII (1983) に記載されている。

また、図 1 A (c) は 0.9 Kb の XbaI-EcoRI 断片に相当する J<sub>H</sub> プロンプ (Cell 24:353-365 (1981) 参照) と EcoRI で切断した DNA のサザンハイブリダイゼーションを示す。先に述べた理由を基に D10 株 DNA にだけ探索される 5.5 Kb の DNA を機能的な H 鎖の V 領域遺伝子を含む断片 λファージ EcoRI ベクターである λgtWES-λB (P. Leder, Science 196:175-177 (1977) 参照) を用いてクローン化し、クローン VJ<sub>H</sub>243 を得た。クローン VJ<sub>H</sub>243 と MEB 203 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2138-2142 (1980) 参照) の 1.0 Kb の EcoRI 断片に相当する O<sub>κ</sub> プロンプを用いた。D10 株の mRNA とノーザンブロットングを行った結果、2.4 Kb の位置にバンドを見つけた (図 1 A (d) 参照)。クローン VJ<sub>κ</sub>1.4 と VJ<sub>H</sub>243 に含ま

-9-

B. Meth. Enzymol. 68:299-309 (1979) 参照) 次に J<sub>κ</sub> プロンプをスクリーニングに用いベントンダイブス法 (Science 196:180-182 (1977) 参照) にしたがつてブランクハイブリダイゼーションを行いクローン VJ<sub>κ</sub>1.4 を単離した。このクローンの制限酵素地図を表 1 B (a) に示す。このクローン VJ<sub>κ</sub>1.4 の HindIII 挿入断片をノーザンハイブリダイゼーションを行うために単離した。

D10 株からグアニジンニウムメソシアネート法 (Biochemistry 18:5294-5299 (1979) 参照) により全 RNA を分離し、オリゴdT セルロースカラムの素通り画分からポリ A 帯をもつ mRNA を得た。図 1 A (b) は D10 株の mRNA と、クローン VJ<sub>κ</sub>1.4 の HindIII 挿入断片或は O<sub>κ</sub> 領域を含む 3 Kb HindIII-BamHI 断片 (利根川進氏より得た、Nature 280:288-294 (1979) 参照) に相当する O<sub>κ</sub> プロンプとのノーザンハイブリダイゼーションを示している。J<sub>κ</sub> と O<sub>κ</sub> の両プロンプにより 1.2 Kb の位置にバンドが見つかった。

-8-

れる活性な V 遺伝子が特異性の発現に關与する。

#### ヒト O 遺伝子の単離

ヒトの血漿の中で主要な免疫グロブリンクラスである IgG の定常領域の遺伝子を単離する。すなわちヒトの免疫グロブリン遺伝子の塩基配列はマウスのそれと高い相同性を示しているの、ヒトのゲノムに存在する例えば O<sub>κ</sub> と Or1 遺伝子をそれに相当するマウスの遺伝子をプロンプとして用いて単離するのであつて、その方法はクローン Ig146 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4709-4713 (1978) 参照) からの 3 Kb の HindIII-BamHI 断片とクローン MEP10 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:474-478 (1981) 参照) からの 6.8 Kb の EcoRI 断片をプロンプとして用いヒトのラムダ charon 4A の HaeIII-AluI 遺伝子ライブラリー (T. Nantais, Cell 15:1157-1174 (1978) 参照) 中からヒト O<sub>κ</sub> 遺伝子を含みエンハンサー領域を保持している断片を単離する。Or1 遺伝子はヒト胎子単細胞 DNA を HindIII で切断しアガロースゲル電気泳動で大き

-10-

さにしたがつて分離したのち5.9 Kbのバンドを1788に挿入し前記のプロブを用いてクローン化した。単離したクローンは図1B(c)のHOx2と(d)のHG163である。

V<sub>H</sub>(マウス)遺伝子とO<sub>H</sub>(ヒト)遺伝子を含むプラスミドpSV2-HOxVD<sub>10</sub>作成

エンハンサーを保持したヒトO<sub>H</sub>遺伝子を含む1.8 KbのPvu II断片を図1B(c)に示すクローンHOx2から単離し等量混合したHind IIIとBamHIリカカー(宝酒造製)を結合したのちHind IIIで切断する。この断片を図1B(c)に示すVJx14から単離した6.5 KbのHind III挿入断片と結合し、BamHIで切断する。得られた断片を分別しアガロースゲル電気泳動により5.9 Kbの断片を単する。この断片をpSV2gptのBamHI部位に挿入する。挿入した遺伝子の方向は、制限地図により決定する。(図2参照 pSV2-HOxVD<sub>10</sub>参照)。

V<sub>H</sub>(マウス)遺伝子とOr1(ヒト)遺伝子を含むプラスミドpSV2-HG1VD<sub>10</sub>作成

8.2 KbのHind III挿入断片をHG163クローン

-11-

2. 室温で30分間保温する。
3. PSU1株をトリプシン処理し、細胞をばらばらにした後10%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地を加えトリプシン処理を終了させる。
4. 培養液を1,500 rpm5分間遠心して細胞を集める。
5. 牛胎児血清を含まない培地に2×10<sup>6</sup>個の細胞を滴下する。
6. 1,500 rpmで5分間遠心する。
7. 直接、1の液1.0 mlに浮遊する。
8. 37℃で3.0分間保温する。
9. 5 mlを別の試験管に移す。
10. 10%牛胎児血清を含むRPMI 1640の培地をそれぞれ4.5 mlずつ加える。
11. 96穴プレートにそれぞれ0.1 mlずつ2×10<sup>6</sup>個の細胞が入る様に分注する。
12. 72時間RPMI 1640-10%牛胎児血清培地で培養する。
13. その後5 μg/mlのミコフエノール酸と

-13-

から単離し、Klenov 酵素により両端の一本鎖部分を消化し、その両端にEcoRI リンカー(宝酒造製)を接続した。その断片をEcoRIとBamHIで切断しEcoRIとBamHIで開環したプラスミドpSV2gptに挿入し、ヒトOr1遺伝子を含むpSV2-HG14クローンを得る。5.5 KbのEcoRI断片をクローンVJH 243から単離しpSV2-HG14のEcoRI切断位置に挿入する。挿入した遺伝子の方向に制限地図により決定した。(図2b pSV2-HG1VD<sub>10</sub>参照)。

プラスミドpSV2-HOxVD<sub>10</sub>及びpSV2-HG1VD<sub>10</sub>による形質細胞膜の形質転換

pSV2-HOxVD<sub>10</sub>とpSV2-HG1VD<sub>10</sub>の両DNAをカルシウム、リン酸共沈降法(proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 1373-1376 (1979 参照)によりプラスミドサイトーマ(形質細胞膜)PSU1株(H鎖は合成しないがL鎖を生産する性質を持つ)に導入した。その方法は次のとおりである。

1. A溶液をそれと等量の2xHeBS溶液に滴下する。

-12-

2.5'0 μg/mlのヤサンチンを含む<sup>RP</sup>PSMI 1640-10%牛胎児血清培地にとりかえ、形質転換した細胞を選択する。  
しかし、A溶液及び2xHeBS溶液は次のような組成を有する。

A 溶液

pSV2-HG1VD <sub>10</sub>	1140 μL	(プラスミド200 μg含有)
pSV2-HOxVD <sub>10</sub>	900 μL	( " )
2 M <sup>CaCl<sub>2</sub></sup> <del>CaCl<sub>2</sub></del>	312.5 μL	(オートクレーブ)
再蒸留水	2647 μL	(滅菌したもの)
2xHeBS溶液	pH7.05	
HEPES	10 g/L	
NaCl	16 g/L	
KCl	0.74 g/L	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・H <sub>2</sub> O	0.25 g/L	
dextrose	2 g/L	

キメラモノクローナル抗体産生形質転換細胞の選別

-14-

キメラモノクローナル抗体産生形質転換細胞の選別には酵素免疫、蛍光抗体法、或はセルソーター (FACS) (ベクトン・デッカンソン社) による解析を用いた。ミコフエノール酸を含む選択培地により18の形質転換細胞クローンが選別された。P3U1株とこれら18の形質転換細胞はプレート中に十分増殖するまで選択培地で育てた。これらの細胞の培養上清を酵素免疫蛍光抗体法 (Meth. Enzymol. 70 419-429 (1980) 参照) によつて抗体の産生状態を試験した。その結果を表1に示す。

表 1

細胞	ウサギ抗ヒトIgG抗体	ウサギ抗ヒトO <sub>7</sub> 抗体
HMH-B1	-	-
HMH-B6	-	-
HMH-B7	+	+
HMH-B8	-	-
HMH-B18	-	-

-15-

最後に10<sup>6</sup>個の細胞を1mlの培養液に浮遊させ、対数増殖器付着のFAOS N (ベクトン・デッカンソン社) で解析した。その結果を図3に示す。図3(a), (b), (c) は標的細胞としてHMH細胞を用いウサギIgGの反応をコントロールとし、それぞれ(a)はウサギの抗ヒトIgG抗体、(b)はウサギの抗ヒトε抗体、(c)はウサギの抗ヒトIgGFc抗体との反応を表わし、(d), (e), (f) はHMH細胞とP3U1細胞に対するそれぞれ(d)はウサギの抗ヒトIgG抗体、(e)はウサギの抗ヒトε抗体、(f)はウサギの抗ヒトIgGFc抗体の反応を表わす。

#### HMH細胞に導入されたDNAの解析

HMH細胞から前述の方法によりDNAとポリA構造を含むmRNAを単離する。HMH細胞のDNAと同様に単離したO57BL/6腎臓細胞とP3U1細胞のDNAをBamHIで切断しJ<sub>H</sub>(マウス)プロローブ(表4A-(a))、O<sub>7</sub>(ヒト)プロローブ(表4A-(b))、J<sub>H</sub>(マウス)プロローブ(表4A-(c))及びO<sub>7</sub>(ヒト)プロローブ(表4A-(d))を用いサザンハイブリダイゼーションを行う。

-17-

HMH-B7は1×10<sup>6</sup>個の細胞が10mlの培養上清に約100μg/mlのマウス・ヒトキメラモノクローナル抗体を産生している。

#### 抗ヒトIgGを用いたHMH細胞とP3U1のセルソーター解析

HMH細胞とP3U1株はHank'sの平衡塩類溶液 (Gibco) で2度洗浄し10<sup>6</sup>個の細胞を750μlの染色緩衝液 (1%, FCS-RPM10 1:1.6.4.0) と250μlのウサギ抗ヒト免疫グロブリン抗体又は正常ウサギIgG (1μg/ml) の混合液に浮遊させ、1時間室温で保温した。その後細胞を3度洗浄した。その後の手順はベクター・ラボラトリ社のアビジンビオチンキット (avidin-biotin kit) に示されているものと同様である。要領としては細胞を予めヒトIgGで吸収処理したビオチン結合抗ウサギIgG (1.5μg/ml) 200倍希釈溶液250μlに浮遊し、1時間、室温で保温した後、Hank's溶液で3度洗浄し、250μlの20倍希釈アビジンFITC (5μg/ml) に浮遊させ室温で30分間保温し、Hank's溶液で3度洗浄する。

-16-

ヒトO<sub>7</sub>とマウスJ<sub>H</sub>プロローブはpSV2-HO<sub>7</sub>VD<sub>10</sub>のBamHI挿入断片のサイズに相当する5.9KbのバンドをHMH細胞のDNA中に探索した。マウスJ<sub>H</sub>プロローブはpSV2-HG1VD<sub>10</sub>のV<sub>H</sub>遺伝子を含むEcoRI挿入断片に相当する5.5KbのバンドをHMH細胞のDNA中に探索した。ヒトO<sub>7</sub>1プロローブはpSV2-HG1VD<sub>10</sub>のO<sub>7</sub>1遺伝子を含むEcoRI-BamHI挿入断片をHMH細胞のDNA中に探索した。これらによりHMH細胞にはゲノム中に完全なH鎖とL鎖のキメラ遺伝子を保持していることが示された。

HMH細胞より単離したポリA構造をもつmRNAとP3U1より単離したポリA構造をもつmRNAをそれぞれVJ<sub>κ</sub>14プロローブ、ヒトO<sub>7</sub>1プロローブ、VJ<sub>H</sub>248プロローブ及びヒトO<sub>7</sub>1プロローブとの間でノーザンブロッティングを行った。VJ<sub>κ</sub>14プロローブとヒトO<sub>7</sub>1プロローブにより通常κ鎖を生産している細胞にみられるのと同じサイズに相当する1.2Kbのバンドがキメラ抗体のL鎖のmRNAとして探索され、HMH細胞のmRNA中に

-18-

最初に転写されたもので、またスプライシングがされていないためイントロンがとり除かれていない mRNA が 5 Kb のバンドとして探索される。(図 4 B (a)(b) 参照) VJH243 として O<sub>1</sub>I プロンプにより H M H 細胞の mRNA 中に 3.5 Kb と 7 Kb のバンドが探索され、3.5 Kb のバンドは膜結合型の r H 鎖の mRNA のサイズに相当し、7 Kb のバンドは最初に転写されイントロンがとり除かれていない mRNA に相当する。

以上により H M H 細胞中でマウス由来の V-(D)-J エクソンとヒト由来 O エクソンの間で最初に転写された mRNA のスプライシングが部分的に起っていることが証明された。

#### 4. 図面の簡単な説明

図 1 A は活性化マウス V 遺伝子とヒトの O 遺伝子を単離するためのサザンハイブリダイゼーション及びそれらの mRNA のノーザンブロットングの解析結果を示す X 線写真

B は単離したクローンの制限酵素地図

図中 E<sub>1</sub> はエンハンサー、H は Hind III、

-19-



B は BamHI、E は EcoRI、P は PvuII を表す

図 2 は DNA 形質転換に用いるために作成したプラスミド構造

a) プラスミド pSV2-HOxVDr の構造

b) プラスミド pSV2-HGIVDr の構造

図 3 はセルソーター解析図

図 4 A は H M H 細胞の DNA のサザンハイブリダイゼーション

B は H M H 細胞の mRNA のノーザンブロットング解析結果を示す X 線写真

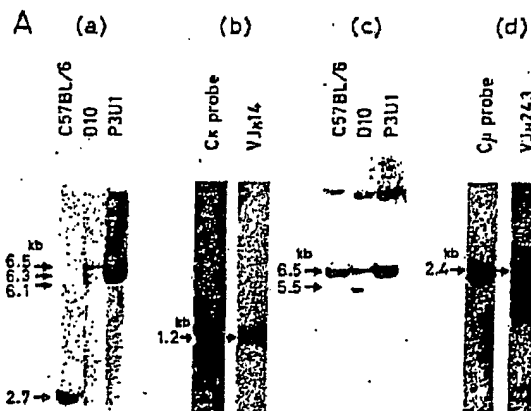
出 版 人 新技術開発事業団

代 理 人 田 中 宏

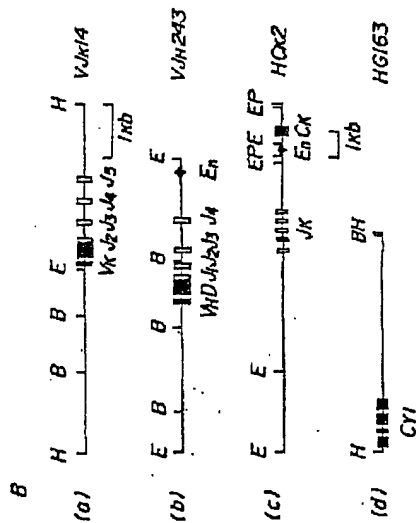
-20-

図面の浄写(内容に変更なし)

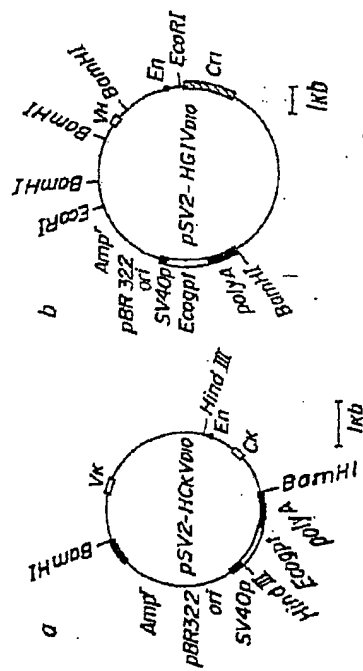
#### 第 1 図 A



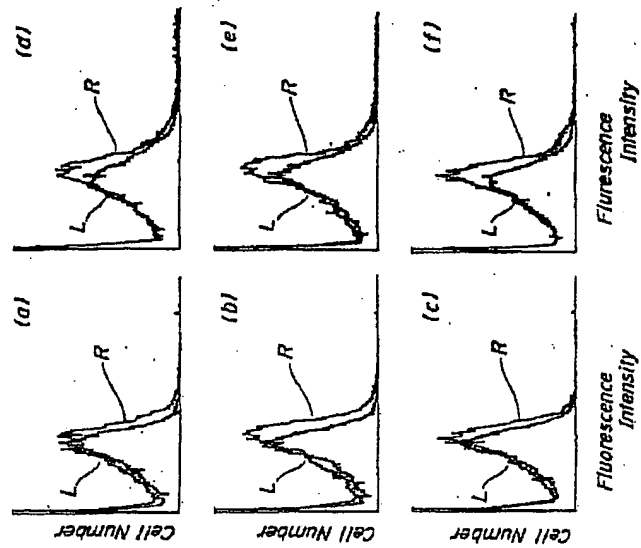
第1図B



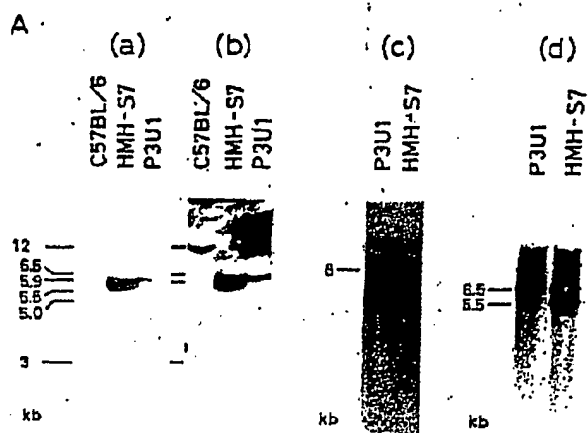
第2図



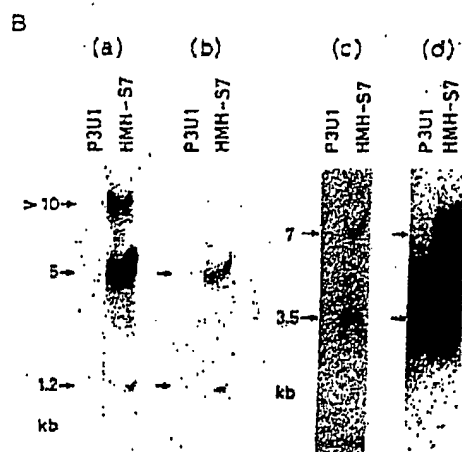
第3図



第4図 A



第4図 B



## 手続補正書

昭和59年9月27日

特許庁長官 志賀 学 殿

## 1. 事件の表示

昭和59年特許願第169370号

## 2. 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都千代田区永田町二丁目5番2号

名 称 新技術開発事業団

理事長 久良知 軍 悟

## 4. 代理人 〒105

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目5番5号

ニュー虎ノ門ビル5階(電話03-501-1830)

氏 名 8940 弁理士 田 中 宏



## 5. 補正命令の日付 自発補正

## 6. 補正により増加する発明の数 なし

## 7. 補正の対象 図面

## 8. 補正の内容

図面の添書(内容に変更なし)

1. 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。
2. 明細書3頁5行目「Milateim」を「Mile-tein」と補正する。
3. 同頁9行～10行目「パール」を「パール」と補正する。
4. 同5頁16行目「0o8」を「008」と補正する。
5. 同10頁16行目「T. Nanistie」を「T. Manistie」と補正する。
6. 同書同頁19行目「胎子単細胞」を「胎児肝細胞」と補正する。
7. 同書11頁6行目「プラズミド」を「プラスミド」と補正する。
8. 同書同頁14行～15行目「断片を単する」を「断片を単離する」と補正する。
9. 同書12頁9行目「向に制限」を「向は制限」と補正する。
10. 同書15頁2行目「酵素免疫、蛍光抗体法」を「酵素免疫蛍光抗体法」と補正する。
11. 同書16頁8行目「FOS-RPM10 11 640」

## 手続補正書

昭和59年10月31日

特許庁長官 志賀 学 殿

## 1. 事件の表示

昭和59年特許願第169370号

## 2. 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都千代田区永田町二丁目5番2号

名 称 新技術開発事業団

理事長 久良知 軍 悟

## 4. 代理人 〒105

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目5番5号

ニュー虎ノ門ビル5階(電話03-501-1830)

氏 名 8940 弁理士 田 中 宏



## 5. 補正命令の日付 自発補正

## 6. 補正により増加する発明の数 なし

## 7. 補正の対象

明細書、特許請求の範囲及び発明の詳細な説明の欄

## 8. 補正の内容

- を「FOS-RPMI 1640」と補正する。
12. 同書20頁1行目「PはpvuⅡ」を「PはPvuⅡ」と補正する。

以上

(別紙)

「特許請求の範囲」

- (1) ヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるキメラモノクローナル抗体
- (2) ヒト以外の動物としてマウスである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (3) ヒト以外の動物としてラットである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (4) ヒト以外の動物の抗体産生細胞から単離した活性な $V_H$ と $V_L$ 遺伝子及びヒトDNAから単離した $C_H$ と $C_L$ 遺伝子を発現ベクターに挿入し、動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を生産することを特徴とするヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域とからなるキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (5) 抗体産生細胞としてハイブリドーマ、エプ

スタインバールウイルスによる形質転換B細胞またはクローン化B細胞を用いる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法

- (6) ベクターとしてpSV2-gpt, pSV2-neo, SV40からなる群から選ばれたベクターを使用することからなる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (7) 動物培養細胞がヒト、サル、マウス等の動物に由来するリンパ腫、腎細胞、L細胞、OOS細胞、HeLa細胞の何れか一種を使用する特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法